

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
8. Jg., S. 269—272, Mai 1970

# Eine Vorrichtung zur Konstanthaltung kleiner Substratkonzentrationen bei kinetischen Messungen mit dem pH-Stat

Von IRENE ROSSMANN, F. KÖRBER und P. SIEGMUND

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 10. März 1970)

Ein pH-Stat wird mit einer Bürettenkombination versehen, mit der dem Bestimmungsansatz eine Substratlösung mit gleicher Geschwindigkeit zugeführt wird wie das zur Neutralisation benötigte Titrationsmittel. Bei gleichen molaren Konzentrationen von Substratlösung und Titrationsmittel wird dadurch die Substratkonzentration im Bestimmungsansatz konstant gehalten. Auch bei kleinen Substratkonzentrationen werden so für einige Minuten gerade Zeit-Umsatz-Kurven erhalten. Die Methode wird bei der Bestimmung der  $K_m$ -Werte von Penicillinase und Lactatdehydrogenase erprobt.

## *An apparatus for maintaining the constancy of low substrate concentrations in kinetic measurements with a pH-stat*

A pH-stat is equipped with a combination of burettes, arranged so that substrate solution and the titration reagent required for neutralisation, are added to the reaction mixture at the same rate. If the molar concentrations of the substrate solution and the titration reagent are the same, the substrate concentration in the reaction mixture remains constant. In this way, even for low substrate concentrations, rectilinear reaction-time curves are obtained over a few minutes. The method has been tested in the determination of the  $K_m$ -values of penicillinase and lactate dehydrogenase.

Reaktionen, bei denen Wasserstoffionen verbraucht oder freigesetzt werden, können mit der pH-Stat-Methode verfolgt werden (1). Bei dieser Methode wird die Zufuhr des zur Konstanthaltung eines vorgegebenen pH-Wertes benötigten Titrationsmittels aus einer mechanisch betriebenen Bürette durch das Potential der Glaselektrode gesteuert. Ein mechanischer Schreiber registriert den zeitlichen Verlauf dieser Zugabe. Die Methode wird z. B. bei der Messung von Enzymaktivitäten von Esterasen und Amidasen benutzt. Sollen mit solchen Messungen Michaeliskonstanten ermittelt werden, so müssen oft Reaktionsgeschwindigkeiten bei sehr kleinen Substratkonzentrationen gemessen werden. Da andererseits bei genaueren Messungen die Konzentration des Titrationsmittels nicht kleiner als 10 mM und der Verbrauch pro Minute nicht kleiner als 20  $\mu$ l sein sollte, muß die Enzymkonzentration entsprechend gewählt werden. Bei solchen Messungen nimmt dann die Substratkonzentration im Ansatz und dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit sehr schnell ab, und es werden stark gekrümmte Zeit-Umsatz-Kurven erhalten, deren Auswertung mit erheblichen Fehlern verbunden ist. Der Versuch, dieser Abnahme der Substratkonzentration im Ansatz dadurch zu begegnen, daß dem Titrationsmittel die gleiche molare Menge Substrat zugesetzt wird, scheitert meist daran, daß die üblichen Substrate im Titrationsmittel nicht beständig sind.

Wir haben deshalb eine Vorrichtung gebaut, mit der Titrationsmittel und Substratlösung gleicher Konzentrationen simultan aus zwei Kolbenbüretten mit gleicher Geschwindigkeit zugeführt werden.

## Material und Geräte

Extinktionsmessungen erfolgten mit dem Photometer Eppendorf (Cd-Lampe, Filter Cd 480 nm) oder mit dem Spektralphotometer PMQ II (Zeiss). Die pH-Stat-Methode wurde mit der Titrations-einrichtung von Radiometer Kopenhagen, bestehend aus Büretten-einheit SBU 1a, Rührmotor SMP 1a, Titrator TTT 1c und Titri-graph SBR 2c durchgeführt. Die zusätzliche Anordnung ist im Text beschrieben (Abb. 1).

Das verwendete Benzylpenicillin (Natriumsalz) war Testpenicillin (Hoechst, 1650 E/mg). Als Penicillinase<sup>1)</sup> wurde das Handelspräparat Neutrapen (Riker, Northridge, California), das als Lyophilisat in Ampullen erhältlich ist, verwendet.

Lactatdehydrogenase<sup>1)</sup>-Suspension (aus Kaninchenmuskel, Bande 5, nativ, 5 mg/ml) und NADH waren Präparate von Boehringer, Mannheim.

Die übrigen Chemikalien waren analysenreine Substanzen des Handels, zur Bereitung der Lösungen wurde bidest. Wasser aus Glasapparaturen benutzt.

**Penicillinase-Lösung:** Der Inhalt einer Ampulle Neutrapen wurde in 2 ml bidest. Wasser gelöst. Die so erhaltene Lösung enthielt etwa 670 U/ml<sup>2)</sup>. Vor der Verwendung wurde die Lösung 1:100 mit 1 mM Phosphatpuffer, pH 6,8, der 0,5% Gelatine enthielt, verdünnt. Diese Lösung ist im Eisbad für einige Stunden mit unveränderter Aktivität haltbar.

**Herstellung der 20 mM Penicillinlösung** für die Beschickung der Kolbenbürette: Eine Kolbenbürette der Büretteneinheit (Abb. 1) wurde mit einer Penicillinlösung, die etwas konzentrierter als 20 mM war (200 mg Penicillin in 20 ml 1 mM Phosphatpuffer pH

<sup>1)</sup> Enzyme: Penicillinase = Penicillin Amido- $\beta$ -lactamhydrolase (EC 3.5.2.6)

Lactatdehydrogenase = L-Lactat: NAD Oxydo-reduktase (EC 1.1.1.27)

<sup>2)</sup> Angabe in internationalen Enzymeinheiten: Substratumsatz in  $\mu$ Mol/Min. bei 25°. Davon zu unterscheiden sind die (hier nicht benutzten) Penicillinase-Einheiten nach G. B. LÉVY (Nature London 166, 740 [1950]): Eine Einheit ist hier die Enzymmenge, die eine Einheit Penicillin in einer Minute bei 25° und pH 7,0 spaltet.

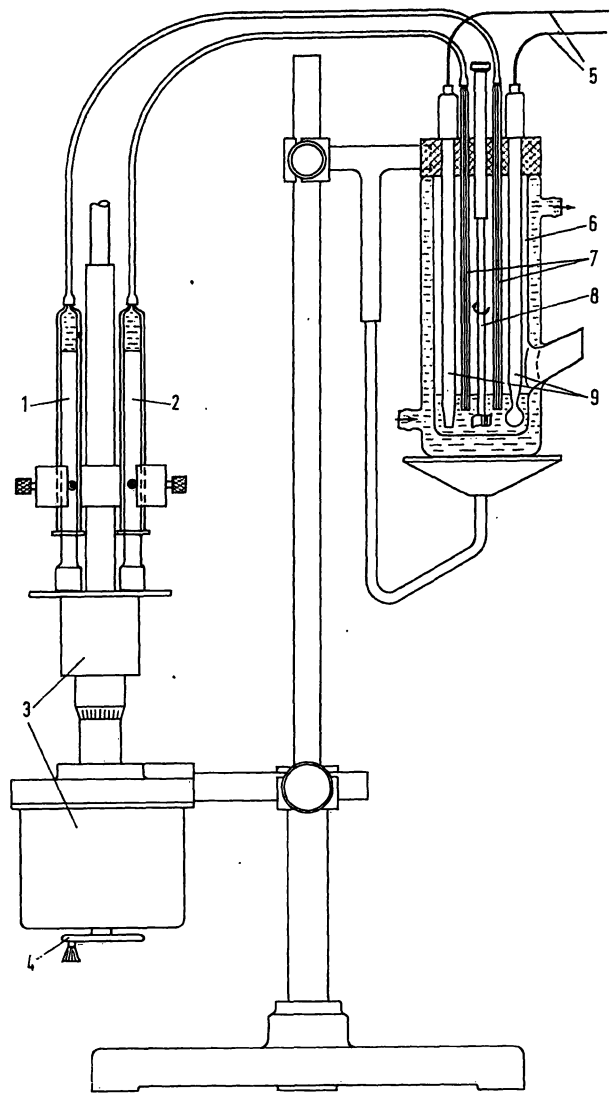
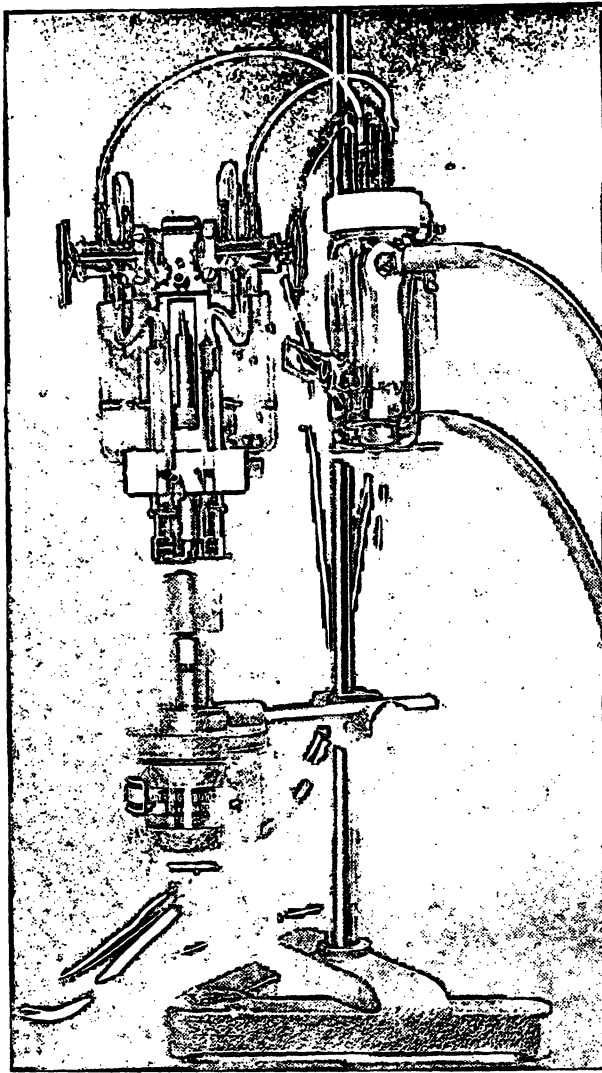


Abb. 1

Büretteneinheit für den simultanen Betrieb eines pH-Statens mit zwei 1-ml-Kolbenbüretten

- 1 = Kolbenbürette für Titrationsmittel  
2 = Kolbenbürette für Substratlösung  
3 = mechanischer Bürettenvorschub, mit Schreiber gekoppelt  
4 = Handrad

- 5 = Anschluß zum pH-Statens  
6 = temperiertes Reaktionsgefäß  
7 = Einleitungskapillaren  
8 = Rührer  
9 = Elektroden

6,8) beschickt. 0,5 ml dieser Lösung wurden (durch Betätigung des Handrades) zu 10,0 ml 1 mM Phosphatpuffer pH 6,8 gegeben. Durch Zusatz von 20  $\mu$ l unverdünnter Penicillinase-Lösung wurde das Penicillin zu Benzylpenicillosäure hydrolysiert und diese mit 20 mM NaOH aus der zweiten Kolbenbürette des pH-Statens wieder auf pH 6,8 titriert. Die Konzentration der Penicillinlösung wurde dann durch Verdünnen dem Titer der 20 mM NaOH angeglichen.

**Lactatdehydrogenaselösung:** 100 mg Gelatine wurden in 20 ml 1 mM Trispuffer pH 7,5 unter Erwärmen gelöst und nach Abkühlen und pH-Kontrolle 40  $\mu$ l Lactatdehydrogenase (5 mg/ml) zugefügt. Die Lösung ist im Eisbad einige Stunden mit unveränderter Aktivität haltbar.

**Herstellung der 10 mM NADH / 10 mM Natriumpyruvatlösung für die Beschickung der Kolbenbürette:** 22 mg Natriumpyruvat wurden im 20-ml-Meßkolben in 10,0 ml 20 mM NADH-Lösung (s.u.) gelöst und nach Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,5 mit bidest. Wasser auf 20,0 ml aufgefüllt.

**20 mM NADH-Lösung:** Eine Probe einer NADH-Lösung, die etwas konzentrierter als 20 mM war (256 mg NADH in 15 ml mit einem Tropfen verd. NaOH alkalisiertem bidest. Wasser) wurde mit 1 mM Trispuffer pH 7,5 1:20 verdünnt (etwa 1 mM NADH). Die Konzentration dieser Lösung wurde photometrisch ( $d =$

0,5 cm,  $\lambda = 366$  nm) bestimmt und die Konzentration der Stamm-Lösung entsprechend dem Meßergebnis durch Verdünnen korrigiert.

### Beschreibung der Methode und Diskussion

Zunächst wurde überprüft, mit welcher *Genauigkeit* die Volumina der Lösungen, die aus den Kolbenbüretten der Büretteneinheit beim simultanen Hub der Kolben abgegeben werden, übereinstimmen. Hierzu wurden beide Kolbenbüretten mit der gleichen 0,2 mM  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ -Lösung gefüllt. In zwei 4-cm-Küvetten wurden zu je 10 ml 0,1M KSCN-Lösung über Kapillarschläuche in Schritten von 50 Skalenteilen (Nonius der Büretteneinheit) simultan aus beiden Bürettenspritzen die  $\text{Fe}(\text{III})$ -Lösungen in je eine Küvette gepumpt. Nach dem Mischen wurden die Extinktionen bei  $\lambda = 480$  nm (entspricht dem Absorptionsmaximum des Eisen(III)-Thiocyanat-Komplexes) am Eppendorf-Photometer (Cd-Lampe) gegen Wasser gemessen. Die gemessenen

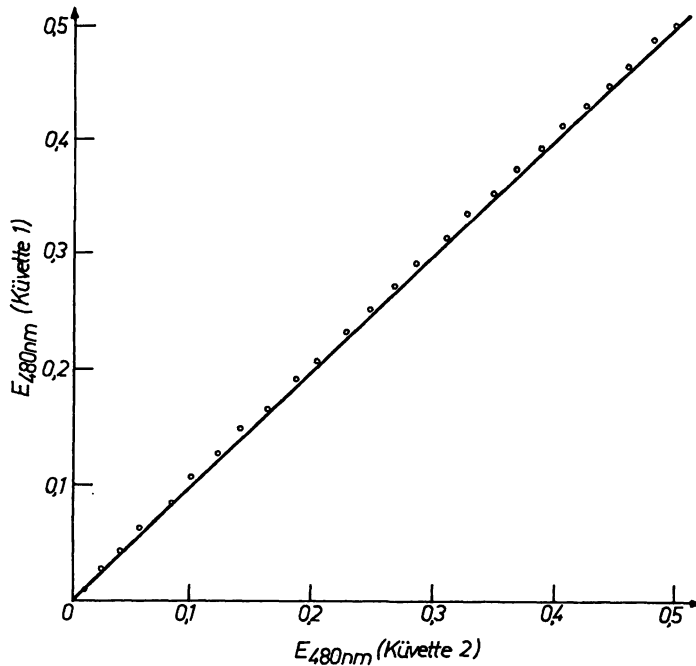


Abb. 2

Prüfung der Übereinstimmung der beiden Kolbenbüretten: aus beiden Büretten wurde die gleiche Eisen(III)-Lösung in je eine mit NaSCN-Lösung beschickte Küvette gegeben und die Bildung des Eisen-Rhodanidkomplexes photometrisch verfolgt. Die für die beiden Küvetten erhaltenen Extinktionswerte sind gegeneinander aufgetragen. Die eingezeichnete Gerade entspricht der genauen simultanen Förderung gleicher Teilvolumina

Extinktionen wurden gegeneinander aufgetragen. Das Diagramm (Abb. 2) zeigt, daß die Meßpunkte einer Geraden mit der Steigung  $\text{tg } \alpha = 1$  folgen, d. h., daß die Kolbenbüretten im gesamten Bereich mit ausreichender Genauigkeit übereinstimmen.

*Penicillinase* spaltet im Penicillin die Amidbindung des Lactamringes. Da die entstehende NH-Gruppe im Thiazolidinring steht, besitzt sie nur geringe Basizität und die Titration der durch Dissoziation der Carboxylgruppe entstehenden Wasserstoffionen ist ein Maß für den Fortschritt der Reaktion. Das wurde von CITRI und ZYK (2) zur Bestimmung der *Penicillinase*<sup>3)</sup> mit der pH-Stat-Methode benutzt.

Einige *Penicillinase*-Spezies besitzen sehr kleine Michaeliskonstanten, so daß nur die hier beschriebene Modifi-

kation der Methode für die Bestimmung dieser Konstanten geeignet ist.

Zur *Bestimmung der Penicillinaseaktivität* wurde das auf 25° temperierte doppelwandige Reaktionsgefäß mit 2,0 ml 1 mM Phosphatpuffer pH 6,8, 1,0 ml 0,5proz. Gelatinelösung im gleichen Phosphatpuffer und 200 µl der verdünnten *Penicillinase*lösung beschickt. Der pH-Stat wurde bei stehendem Vorschub so eingestellt, daß die pH-Anzeige des Gerätes mit dem pH-Wert der Lösung (6,8) übereinstimmte. Dann wurde durch Zugabe von 1,0 ml einer *Penicillin*lösung geeigneter Konzentration durch den seitlichen Einfüllstutzen die Reaktion gestartet; der Schreiber des Gerätes zeichnet dann den Hub der Bürettenkolben, der der zur Aufrechterhaltung des vorgegebenen pH-Wertes notwendigen Laugenzugabe entspricht, auf.

Die Parallelschaltung einer mit der *Penicillin*lösung gleicher molarer Konzentration beschickten Kolbenbürette bewirkt den Ersatz des gespaltenen Substrats und damit die Aufrechterhaltung der vorgegebenen Substratkonzentration, wenn man von dem Verdünnungseffekt absieht. Das bedeutet, daß die Reaktionsgeschwindigkeit wenigstens für einige Minuten konstant ist. Der Versuch wurde mit *Penicillin*konzentrationen von 200, 150, 100, 50, 40 und 30 µM im Reaktionsgefäß durchgeführt.

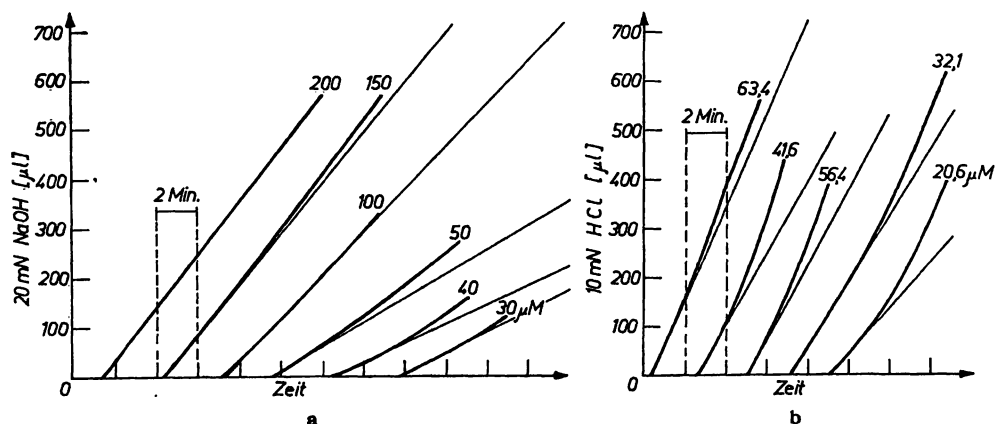
Die erhaltenen Kurven sind in Abbildung 3a wiedergegeben. Zur Auswertung wurden die geraden Anfangsteile verlängert. Nur bei der kleinsten Konzentration ist das Anlegen einer Tangente erforderlich und unsicher. Im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 4a) liegt jedoch auch dieser Wert für 30 µM noch nahe an der Geraden.

Bei der *Bestimmung der Aktivität und der Michaeliskonstanten von Lactatdehydrogenase* ist natürlich die photometrische Messung bei 340 bzw. 366 nm (3) die Methode der Wahl. Indessen erscheint uns dieses so gut untersuchte Enzym geeignet, um die hier beschriebene Versuchsanordnung zu erproben. Das benutzte Enzympräparat war Lactatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel, Bande 5 (nativ); als Substrat, dessen Konzentration von Ansatz zu Ansatz variierte, wurde NADH gewählt, die Pyruvatkonzentration war in allen Ansätzen 1 mM. Als Titrationsflüssigkeit dienten einerseits 10 mM HCl (erste Kolbenbürette) und andererseits eine Lösung, die 10 mM an

<sup>3)</sup> CITRI und ZYK erhielten jedoch zu niedrige Werte, da sie auf pH 6,0 titrierten — einen pH-Wert, bei dem der Thiazolidin-N noch teilweise protoniert ist.

Abb. 3  
Mit dem pH-Staten erhaltene Zeit-Umsatz-Kurven bei gesteuerter Substratzufuhr

a) *Penicillinase*  
b) *Lactatdehydrogenase*  
Ansätze und Reaktionsbedingungen siehe Methodik. Die Zahlen an den Kurven geben die Substratkonzentrationen (µM) in den entsprechenden Ansätzen an



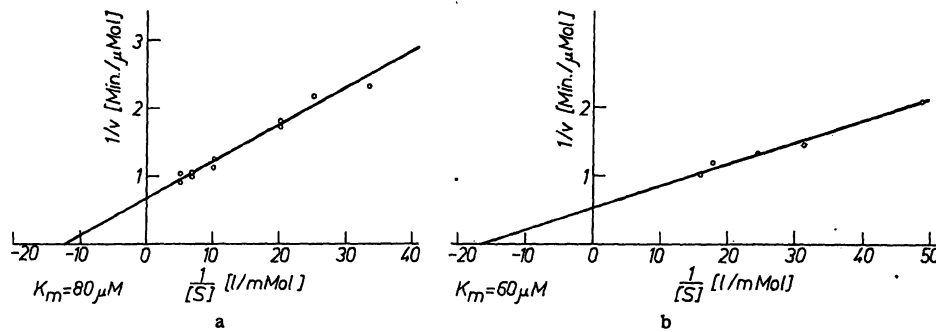


Abb. 4  
Diagramme nach Lineweaver-Burk aus  
den Zeit-Umsatz-Kurven der Abbil-  
dung 3

a) für Penicillinase  
b) für Lactatdehydrogenase

NADH und an Pyruvat war (zweite Kolbenbürette), wodurch erreicht wurde, daß beide Substrate im Maß ihres Verbrauchs nachgeliefert wurden.

Für den Versuch wurde das auf 25° temperierte Reaktionsgefäß mit 3,0 ml/ 1,67 mM Natriumpyruvat-Lösung und 1,0 ml/ Lactatdehydrogenaselösung beschickt. Bei stehendem Vorschub wurde die pH-Anzeige des Geräts auf den pH-Wert der Lösung (pH 7,5) eingestellt, und die Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml/ einer NADH-Lösung geeigneter Konzentration durch den seitlichen Einfüllstutzen gestartet. Die Endkonzentrationen betrugen dann für Pyruvat 1 mM, für Lactatdehydrogenase 2  $\mu$ g/ml. Die Konzentrationen der zugegebenen NADH-Lösung waren durch Extinktionsmessungen kontrolliert worden. Aus diesen Werten wurden die Konzentrationen im Ansatz zu 63,4, 56,4, 41,0, 32,1 und 20,6  $\mu$ M berechnet. Aus den Anfangssteigungen der am Beginn nahezu geradlinigen Zeit-Umsatz-Kurven (Abb. 3b) wurde der Substratumsatz in  $\mu$ Mol/Min. berechnet. Die Reziprokwerte wurden im Lineweaver-Burk-Diagramm gegen die zugehörigen reziproken NADH-Konzentrationen der Ansätze aufgetragen (Abb. 4b). Aus dem Diagramm kann man ersehen, daß auch bei den kleinsten NADH-Konzentrationen noch brauchbare Werte erhalten werden<sup>4)</sup>.

Wie aus den Abbildungen 3a und b zu entnehmen ist, werden vor allem bei den kleinsten Konzentrationen

nur während der ersten Minuten geradlinige Zeit-Umsatz-Kurven erhalten. Bei Kurven, die unter gleichen Bedingungen mit der einfachen pH-Stat-Methode — ohne Substratzufuhr — zu erhalten sind, wäre die Reaktion jedoch schon nach Zufuhr von etwa 10  $\mu$ l Titrationsmittel zum Stillstand gekommen. Für Reaktionszeiten, die mehr als einige Minuten betragen, sind aber auch mit der hier beschriebenen Methode keine Geraden zu erhalten: Da nämlich die Konzentrationen der Zufuhrlösungen 2—3 Zehnerpotenzen größer als die im Ansatz sind, führen bereits geringfügige Abweichungen in der Zufuhr dieser Lösung vom Substratverbrauch bei den kleineren Konzentrationen schnell zu deren Änderung und damit auch zur Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Wir danken Herrn Mechaniker L. SCHREYER für den Bau der Büretteneinheit, Herrn Dr. KETTELHACK, Kettelhack Riker Pharma GmbH., 428 Borken (Westf.), für die Überlassung von Penicillinase und den Farbwerken Hoechst für die Überlassung von Testpenicillin.

<sup>4)</sup> Der hier erhaltene  $K_m$ -Wert ist nicht ohne weiteres mit in der Literatur angegebenen Werten zu vergleichen, da diese sich auf das am aktiven Zentrum mit Pyruvat gesättigte Enzymprotein beziehen.

Wegen der Hemmung durch größere Pyruvatkonzentrationen können diese Werte nur durch Extrapolation aus mehreren Meßreihen bei verschiedenen Pyruvatkonzentrationen erhalten werden (4).

### Literatur

1. JACOBSEN, C. F., J. LÉONIS, K. LINDERSTRØM-LANG und M. OTTESEN, The pH-Stat and Its Use in Biochemistry, Meth. biochem. Analysis 4, 171 (1957). — 2. CITRI, N. und N. ZYK, Biochim. biophysica Acta Amsterdam 99, 427 (1965). — 3. BERG-

MEYER, H.-U., E. BERNT und B. HESS, Lactatdehydrogenase, in: H.-U. BERGMAYER (Hrsg.), Methoden der enzymatischen Analyse, S. 736, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1962). — 4. Zewe, V. und H. J. FROMM, J. biol. Chemistry 237, 1668 (1962).

Professor Dr. P. Siegmund  
1000 Berlin 33  
Arnimallee 22